

PENDAHULUAN

Insektisida yang tergolong organoklorin, organoposfat, karbamat merupakan teratogen yang menyebabkan kelainan perkembangan tulang seperti mikromelia, brevikolis, hambatan osifikasi, dan paruh silang pada burung (Romanof, 1972; Seifert & Casida, 1981, Garrison & Wytenbach, 1985). Brevikolis adalah cacat tulang leher yang menjadi pendek, sedang mikromelia adalah hambatan perkembangan tulang sehingga menjadi kecil dan pendek.

Salah satu alasan penggunaan insektisida dibatasi oleh pemerintah mulai tahun 1986 adalah karena insektisida ini bersifat teratogenik. Sebagai gantinya diedarkan insektisida baru yang dianggap aman yaitu insektisida generasi ke-3, salah satu diantaranya adalah buprofezin. Insektisida ini dikenal dengan nama dagang APPLAUD yang membunuh serangga dalam stadium perkembangan. APPLAUD sebagai andalan untuk memberantas wereng coklat dan kutu loncat pada tahun 1986-1989.

Beberapa laporan tentang pengaruh buprofezin sebagai teratogen sudah muncul. Insektisida ini menyebabkan hambatan kalsifikasi pada humerus sayap, menghambat pertumbuhan tulang paruh bagian atas sehingga lebih pendek dari pada paruh bagian bawah (Sagi, 1989). Terhadap embrio ayam buprofezin menyebabkan cacat siklop, dan paruh silang (Sagi et al., 1990). Pada embrio mencit, insektisida ini menyebabkan cacat eksensefali, dan spina bifida (Sagi & Santanu, 1993). Eksensefali adalah cacat karena tulang tengkorak penutup otak gagal terbentuk sehingga otak terdedah ke luar. Pada spina bifida ruas tulang belakang di daerah lumbo-dorsal gagal terbentuk sehingga sumsum tulang belakang terdedah ke luar. Beberapa kelainan pertumbuhan itu menunjukkan bahwa target efek buprofezin salah satunya adalah proses penulangan.

Tulang merupakan proses perkembangan dari sel tulang rawan yang mengalami osifikasi. Bila dalam tulang rawan (kondrosit) ada sel yang mati atau hambatan proliferasi maka arah pertumbuhan menjadi berubah sehingga dapat menyebabkan kelainan pertumbuhan tulang, yang akhirnya menjadi cacat. Masalahnya adalah bagaimana pertumbuhan dan perkembangan kondrosit di dalam kultur bila diberi perlakuan dengan buprofezin. Kultur sel ini bertujuan untuk mengetahui mekanisme teratogenesis buprofezin terhadap pertumbuhan tulang pada embrio ayam.

BAHAN DAN CARA KERJA

Buprofezin murni diperoleh dari pabrik kimia *WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRY* di Tokyo, Jepang. Buprofezin dilarutkan dalam dimetilsulfoksid (DMSO) kemudian diencerkan dengan medium kultur. Medium kultur yang digunakan adalah *DULBECO MODIFIED ESSENTIAL MEDIUM* (DMEM), diberi zat perangsang tumbuh *FOETAL CALF SERUM* (FCS) 10 % dan antibiotik streptomisin.

Embrio ayam umur 14 hari diperoleh dari pengeraman telur ayam fertil galur KOBU pada temperatur 39°C, kelembaban 60-80 %. Operasi pengambilan tulang rawan dalam ruang steril, dilakukan dalam larutan garam fisiologi *Posphate Buffered Solution* (PBS). Tulang rawan diambil dari sternum, sel dipisahkan dengan tripsin 0,025% pada pemanasan air temperatur 39°C, selama 10 menit. Tripsin diganti dengan medium kultur untuk memberhentikan kegiatan enzim itu, akhirnya sel dihitung dengan alat hitung *NAUBAUER*.

Dosis buprofezin ditentukan dengan ketentuan bahwa uji toksisitas obat terhadap sel maksimum 100 ug/ml (Wilson, dalam Freshney, 1989). Dosis perlakuan yaitu 0,1; 1,0; dan 10 ug/ml medium. Buprofezin ditambahkan dalam medium sebelum sel ditanam.

Penanaman sel dengan jumlah 1000 sel/ml medium pada cawan petri ukuran 5 cm, ditanam sebanyak 2 ml suspensi sel tiap cawan. Ulangan masing-masing perlakuan sebanyak 10 cawan petri. Kultur sel dilakukan dalam inkubator CO₂ dengan kadar 5 %, kelembaban 80 %, dikultur selama 9 hari. Setiap 2 hari sekali medium diperbaharui.

Parameter yang diamati yaitu perilaku sel, proliferasi, diferensiasi dan agregasi sel. Pewarnaan dengan *GIEMSA* dilakukan untuk melihat adanya substansi antar sel tulang rawan (matriks).

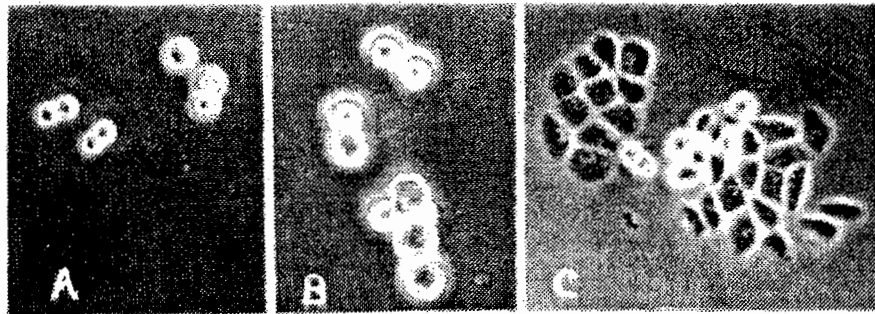
HASIL PENGAMATAN

Sel tulang rawan (kondrosit) di dalam kultur ada yang melekat di dasar cawan dan ada yang sebagai suspensi. Sel yang melekat berbentuk oval, poligonal, stelat dan yang sebagai suspensi berbentuk bulat. Setelah mencapai tingkat konfluen mengalami agregasi dan selanjutnya

membentuk pusat-pusat perkembangan sebagai *nodule*. Kenampakan tersebut tampak pada kultur kondrosit yang tidak dengan perlakuan, dengan kata lain bahwa struktur kultur kondrosit tampak kompak. Kultur kondrosit dengan perlakuan tampak tidak kompak karena pertumbuhan sel mengalami hambatan.

Kultur kondrosit umur 3 hari (Gambar 1)

Kondrosit pada dosis buprofezin 10 ug/ml medium mengalami hambatan perlekatan pada dasar cawan sehingga sebagian besar sel sebagai suspensi, namun demikian mengalami mitosis (Gambar 1 A). Pada dosis 1 ug/ml sel yang melekat dan yang sebagai suspensi berbanding sama. Sel yang melekat berukuran lebih besar karena terjadi pertumbuhan sitoplasma yang melebar pada dasar cawan, sedang yang tersuspensi tetap bulat (Gambar 1 B). Pada dosis 0,1 ug/ml dan kontrol menunjukkan kenampakan yang sama. Sel melekat mengalami diferensiasi bentuk yang kebanyakan berbentuk poligonal dan ada yang oval. Proliferasi sel cepat sehingga membentuk koloni sel yang terdiri dari beberapa bentuk sel (Gambar 1 C)



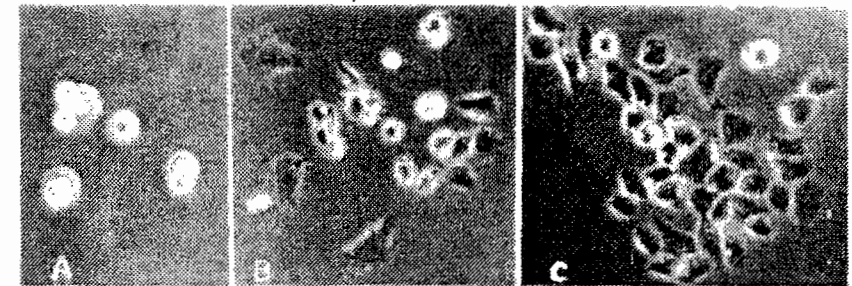
Gambar 1. Kultur kondrosit umur 3 hari

- A. Kultur sel dengan perlakuan buprofezin 10 ug/ml
- B. Kultur sel dengan perlakuan buprofezin 1 ug/ml
- C. Kultur sel kontrol (tanpa perlakuan buprofezin)

Kultur kondrosit umur 6 hari (Gambar 2)

Anggota koloni sel makin banyak karena terjadi proliferasi. Proliferasi sel pada dosis 10 ug/ml tetap mengalami hambatan sehingga anggota koloni tetap sedikit (Gambar 2 A). Pada dosis 1 ug/ml hambatan proliferasi tidak begitu besar sehingga anggota koloni sel lebih banyak dari pada dosis 10 ug/ml. Diferensiasi sel terjadi ada yang berbentuk oval, poligonal dan stelat. Sel yang sudah melekat sejak awal ukurannya paling besar (Gambar 2 B).

Kecepatan proliferasi pada dosis 0,1 ug/ml sama dengan kontrol. Koloni sel satu dengan yang lain menjadi berdekatan karena anggota koloni menyebar dengan gerakan amuboid (Gambar 2 C). Ukuran sel pada koloni yang sudah bersentuhan menjadi kecil. Struktur koloni yang sudah berdesakan seperti irisan tulang rawan pada sediaan histologi.

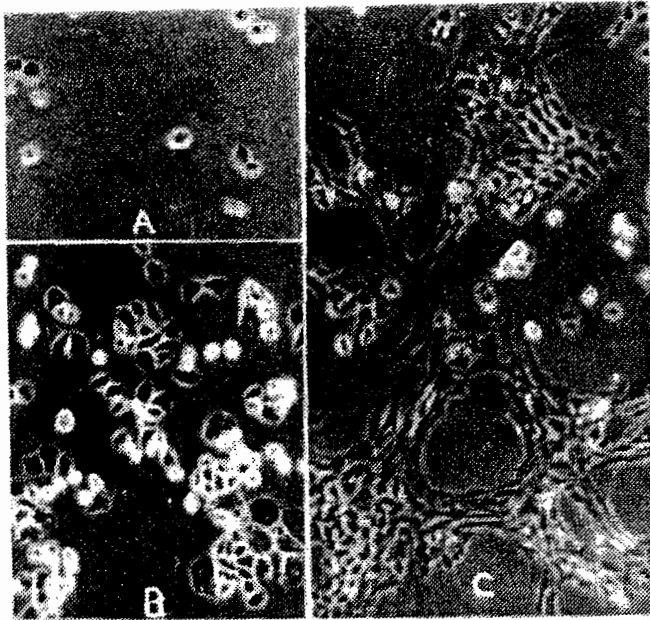


Gambar 2. Kultur kondrosit umur 6 hari

- A. Kultur sel dengan perlakuan buprofezin 10 ug/ml
- B. Kultur sel dengan perlakuan buprofezin 1 ug/ml
- C. Kultur sel kontrol (tanpa perlakuan buprofezin)

Kultur kondrosit umur 9 hari (Gambar 3)

Proliferasi sel pada dosis 10 ug/ml tetap mengalami hambatan sehingga tidak pernah mengalami tingkatan konfluen (Gambar 3 A). Pada dosis 1 ug/ml koloni sel dapat bersentuhan (Gambar 3 B), namun ada sel yang sebagai suspensi. Pada kontrol menunjukkan kelompokan (agregasi). Sel berbentuk poligonal di tengah, dikelilingi oleh sel berbentuk oval atau memanjang (Gambar 3 C). Tampak pula sel yang lepas dari dasar cawan karena sel satu sama lain berdesakan. Sel yang lepas berukuran kecil dan bulat seperti sel yang tersuspensi pada dosis 1 ug/ml.



Gambar 3. Kultur kondrosit umur 9 hari

- A. Kultur sel dengan perlakuan buprofezin 10 ug/ml
- B. Kultur sel dengan perlakuan buprofezin 1 ug/ml
- C. Kultur sel kontrol (tanpa perlakuan buprofezin)

PEMBAHASAN

Percobaan terdahulu dengan buprofezin yang disuntikkan dalam telur berembrio (*in vivo*) menunjukkan bahwa pada embrio ayam terjadi hambatan kalsifikasi. Hambatan itu tampak pada rangka embrio ayam dengan pewarnaan alisarin merah (Sagi, 1989; Sagi et al, 1990). Kelainan pertumbuhan paruh itik bagian atas lebih pendek dibanding dengan paruh bagian bawah. Paruh silang terjadi pada embrio ayam karena perlakuan dengan buprofezin. Mekanisme pertumbuhan tulang abnormal itu belum bisa dijelaskan dengan percobaan *in vivo*. Percobaan kultur kondrosit (*in vitro*) dapat dipakai sebagai model untuk menjelaskan mekanisme terjadinya kelainan pertumbuhan tulang karena efek buprofezin langsung pada sel yang dikultur.

Dalam medium kontrol maupun perlakuan terdapat pelarut buprofezin yaitu DMSO dengan kadar 0,1 % menunjukkan hasil yang sama. Menurut Manduca *et al.* (1988), DMSO tidak berpengaruh pada kultur kondrosit embrio ayam sampai dengan kadar 2 %. Pada kultur sel otot, pengaruh DMSO bersifat reversibel sampai kadar 5 % (Blau & Epstein, 1979).

Kultur kondrosit di dalam medium tanpa agen kimia yang aktif dapat berkembang seperti *in vivo*. Substansi antar sel (matriks) dapat disintesis sehingga tampak seperti struktur tulang rawan pada sediaan histologi yaitu membentuk pusat perkembangan sebagai nodule (Matsutani & Koruda, 1979). Bahkan kondrosit dapat mengalami kalsifikasi di dalam kultur (Tacchett *et al.*, 1989). Kondrosit dalam kultur dapat mensintesis fibronectin dan kolagen sebagai matriks (Dessau *et al.*, 1978). Matriks tulang rawan juga terdiri dari proteoglikan (Kosher, *et al.*, 1986). Matriks mengikat kondrosit satu dengan yang lain membentuk struktur yang kompak seperti pada kontrol (Gambar 3 C). Struktur itu tidak terbentuk pada perlakuan buprofezin 10 ug/ml karena terjadi hambatan proliferasi sehingga tidak mengalami agregasi karena berkurangnya matriks.

Stimulasi sintesis matriks dalam kultur kondrosit terjadi dengan adanya senyawa-senyawa protein tertentu. Carrington *et al.* (1991) melaporkan bahwa osteogenin menstimulasi diferensiasi kondrosit dan sintesis matriks sel tulang rawan sternum embrio ayam. Transforming

Growth Factor (TGF) menstimulasi diferensiasi kondrosit calon tulang sayap ayam (Kulyk *et al.*, 1989). Laminin juga penting untuk diferensiasi kondrosit (Solursh & Jensen, 1988).

Sebaliknya ada agen kimia yang dapat menghambat diferensiasi kondrosit dan sintesis matriks. Watanabe *et al.* (1979) mengatakan bahwa tunikamisin menghambat proliferasi, diferensiasi, adesi kondrosit calon vertebra embrio ayam dalam kultur. Horton *et al.* (1987) melaporkan bahwa asam retinoat (vitamin A) menyebabkan hambatan sintesis matriks dan merubah diferensiasi jenis kondrosit. Kultur kondrosit selama 48 jam dalam medium yang mengandung asam retinoat dapat menghentikan sintesis matriks. Vitamin A juga menyebabkan hambatan diferensiasi kondrosit calon tulang-tulang muka embrio ayam dalam kultur (Wedden *et al.*, 1987). Selanjutnya dijelaskan apabila efek itu terjadi *in vivo* dapat menyebabkan terjadinya kelainan di bagian muka anak ayam seperti paruh silang, paruh panjang-pendek dan muka asimetris. Kajian itu dipakai untuk menjelaskan kelainan di bagian wajah bayi yang lahir cacat di bagian mukanya.

Hasil pengamatan *in vitro* menunjukkan bahwa buprofezin menghambat adesi, proliferasi, diferensiasi, agregasi kondrosit seperti halnya efek tunikamisin dan vitamin A. Pengaruh buprofezin *in vivo* menunjukkan hambatan kalsifikasi, paruh silang, paruh panjang-pendek. Mekanisme terjadinya kelainan itu karena kondrosit mengalami hambatan diferensiasi dan hambatan sintesis matriks sehingga menyebabkan pertumbuhan abnormal atau cacat pada organ yang mengandung tulang rawan.

DAFTAR PUSTAKA

- Blau, H.M. and C.J. Epstein. 1979. Manipulation of myogenesis in vitro: Reversible inhibition by DMSO. *Cell*. 17. 95-108.
- Carrington, J.L., Chan, P., Yanaghisita, M., and A.H. Reddi. 1991. Osteogenin (bone morphogenetic protein 3) stimulates cartilages formation by chick limb bud cell in vitro. *Dev. Biol.* 146. 406-415.

- Dessau, W., Sasse, I., Timpl, R., Jilek, F., and K.Mark. 1978. Synthesis and extracellular deposition of fibronectin in chondrocytes cultures. *J. Cell. Biol.* 79. 342 - 355.
- Freshney, I. 1989. *Animal Cell Culture: A practical Approach*. IRL Press. Oxford. 248 p.
- Garrison, J.C. and C.R. Wytenbach. 1985. Notochordal development as influenced by the insecticide DICHROTOPOS. *The J. Exp. Zool.* 234. 243-250.
- Horton, W.E., Yamada, Y., and J.R. Hassel. 1987. Retinoic acid rapidly induced cartilage matrix synthesis by altering gene transcription in chondrocytes. *Dev. Biol.* 123. 508-516.
- Kosher, R.A., Gay, S.W., Kamanitz, J.R., Kulyk, W.M., Rodgers, B.J., Tanaka, T., and H.L. Tanzer. 1986. Cartilage proteoglycan core protein gene expression during limb bud differentiation. *Dev. Biol.* 118. 112-117
- Manduca, P., Costanogla, P and P. Canceda. 1988. Dimethylsulfoxide interferes with in vitro differentiation of chick embryo endochondral chondrocytes. *Develop. Biol.* 125. 234-236.
- Kulyk, W.A., Rodgers, B.J., Green, K., and R.A. Kosher. 1989. Promotion of embryonic chick limb bud cartilage differentiation by transforming growth factor (TGF). *Dev. Biol.* 135. 424-430.
- Matsutani, E., and Y. Koruda. 1979. Enhancement of chondrogenesis of cultured Quil limb bud mesenchymal cell by cellophan film. *Cell structure and function*. 3. 237-248.
- Romanoff, A. 1972. *Pathogenesis of avian embryo*. Wiley Interscience. New York. 476 p.
- Sagi, M. 1989. Pengaruh insektisida APPLAUD 10 WP terhadap perkembangan embrio itik. Lembaga Penelitian UGM. 38 p.
- Sagi, M. Istriyati dan M. Gufron. 1990. Pengaruh insektisida APPLAUD 10 WP pada pembentukan lapisan keratin cakar, paruh, tembolok embrio ayam. Lembaga Penelitian UGM. 46 p.
- Sagi, M. dan M. Santanu. 1993. Efek buprofezin terhadap perkembangan sistem saraf pusat embrio mencit (*Mus musculus*). Seminar Biologi Nasional. Ujung Pandang. 12 p.
- Seifert, J. and J.E. Casida. 1981. Mechanism of teratogenesis induced by organophosphate and carbamates insecticide. (In. *Progress in insecticide* ed: D.H. Hudson and T.R. Roberts) 1. 219-246

- Solursh, M., and K.L. Jensen. 1988. The accumulation of basement membrane components during the onset of chondrogenesis and myogenesis in the chick wing bud. *Development*. 104. 41-49.
- Tacchatty, C., Quorto, R., Campenile, R., and R. Canceda. 1989. Calcification in vitro developed hyperthropic cartilage. *Dev. Biol.* 132. 442-447.
- Watanabe, K., Gakuso, T., and H. Mitsui. 1979. Effects of tunicamycine on the proliferation, adhesion, and differentiation of chick embryo chondrocytes in clonal cell cultures. *Cell Structure and Function*. 4. 127-135.
- Watanabe, K. 1985. Regulatory effects of sera and proteinous factors for proliferation and differentiation of chick embryo chondrocytes in culture. (in: *Growth and differentiation of cell in defined medium*, ed : Murakami, H.). Kodanshe-Springer. 245-249.